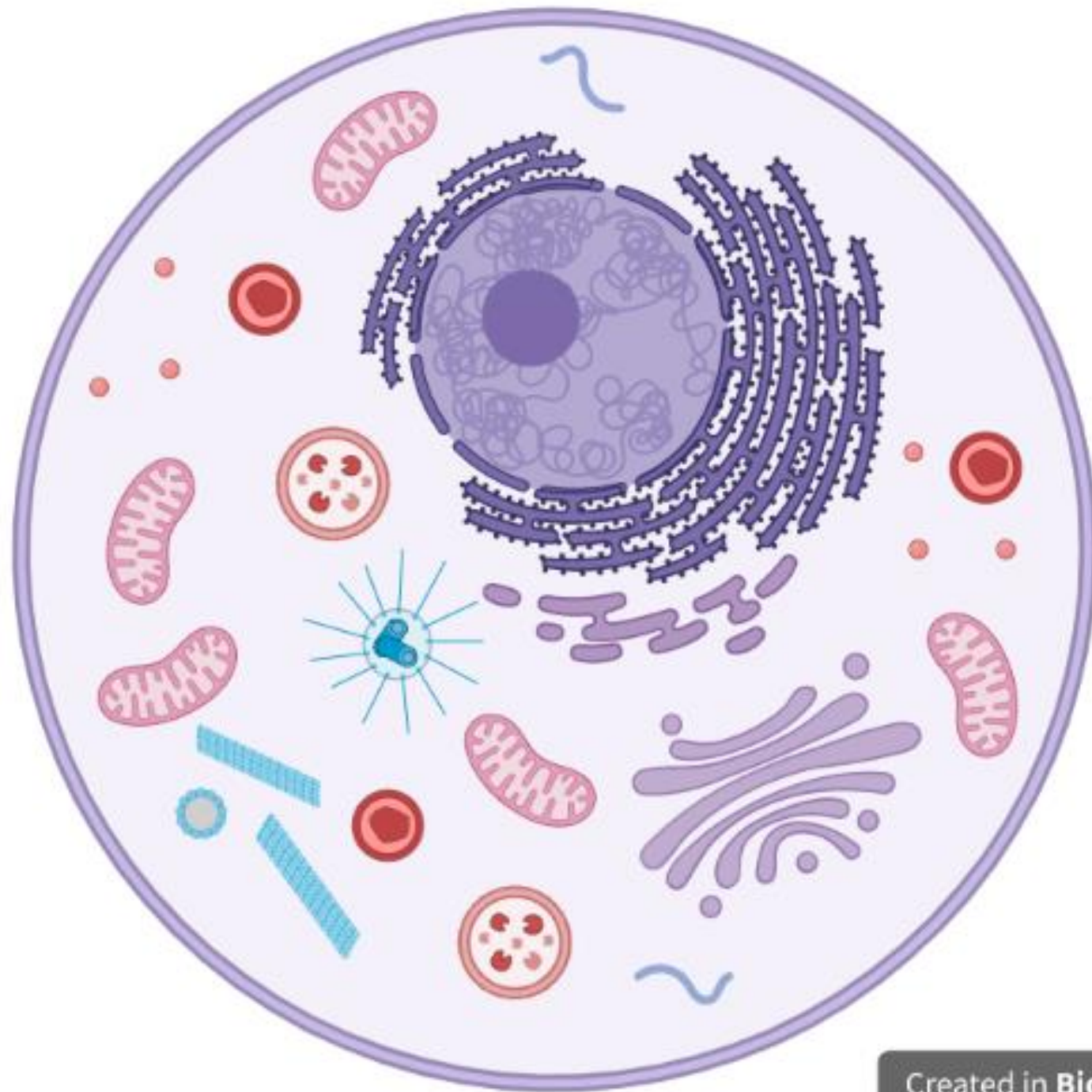


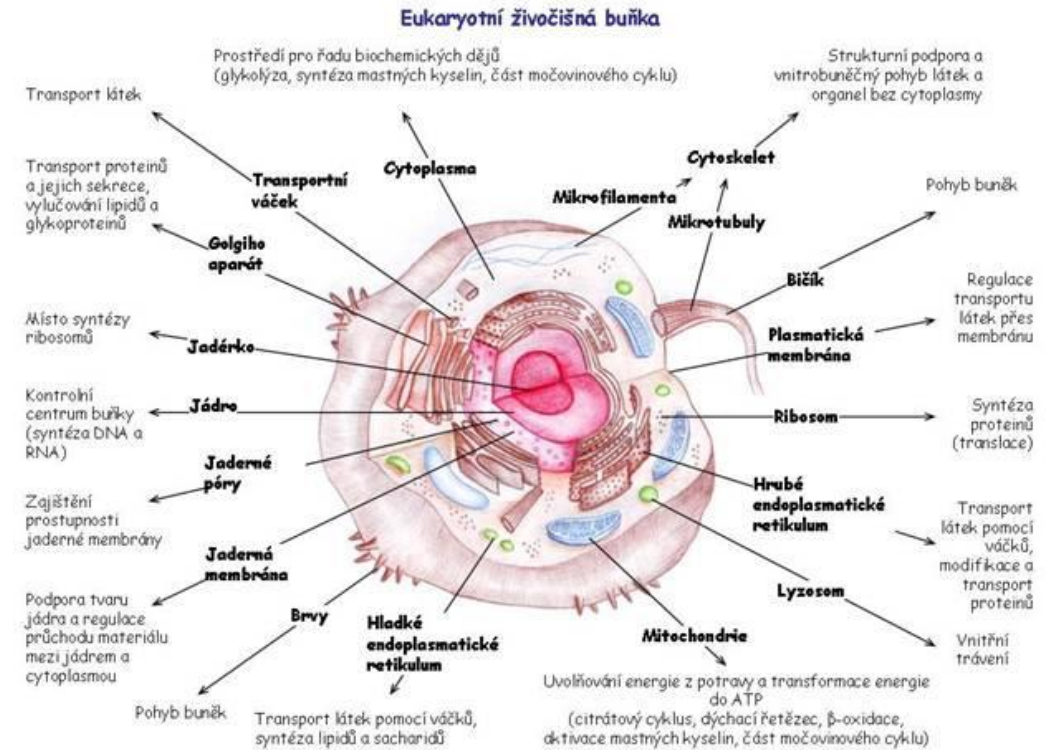
buňka × tkáň × orgán

Stavba buňky



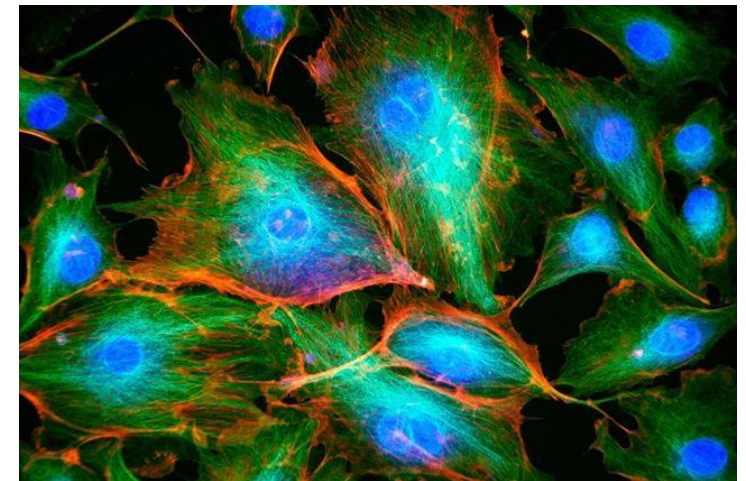
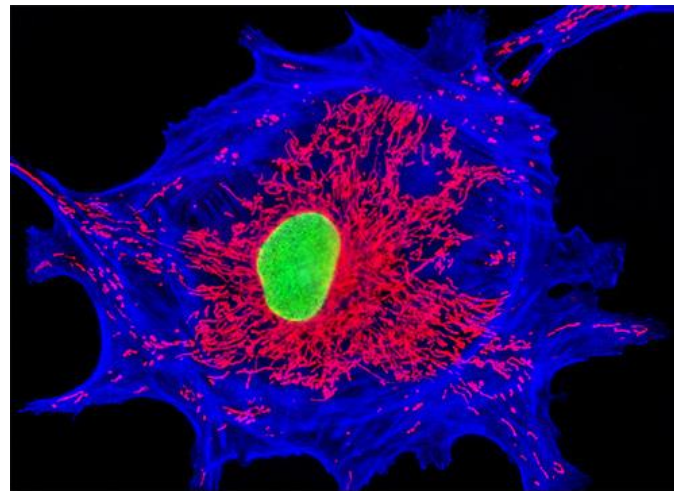
Stavba buňky

- lidské tělo je složeno z $\sim 35 \times 10^{12}$ (bilionů) buněk
- všechny buňky jsou odvozeny od jediné (oplozené vajíčko)



části buňky

- plasmatická membrána
- jádro
- mitochondrie
- endoplasmatické retikulum, ribozomy, Golgiho komplex
- cytoskelet



Buňka

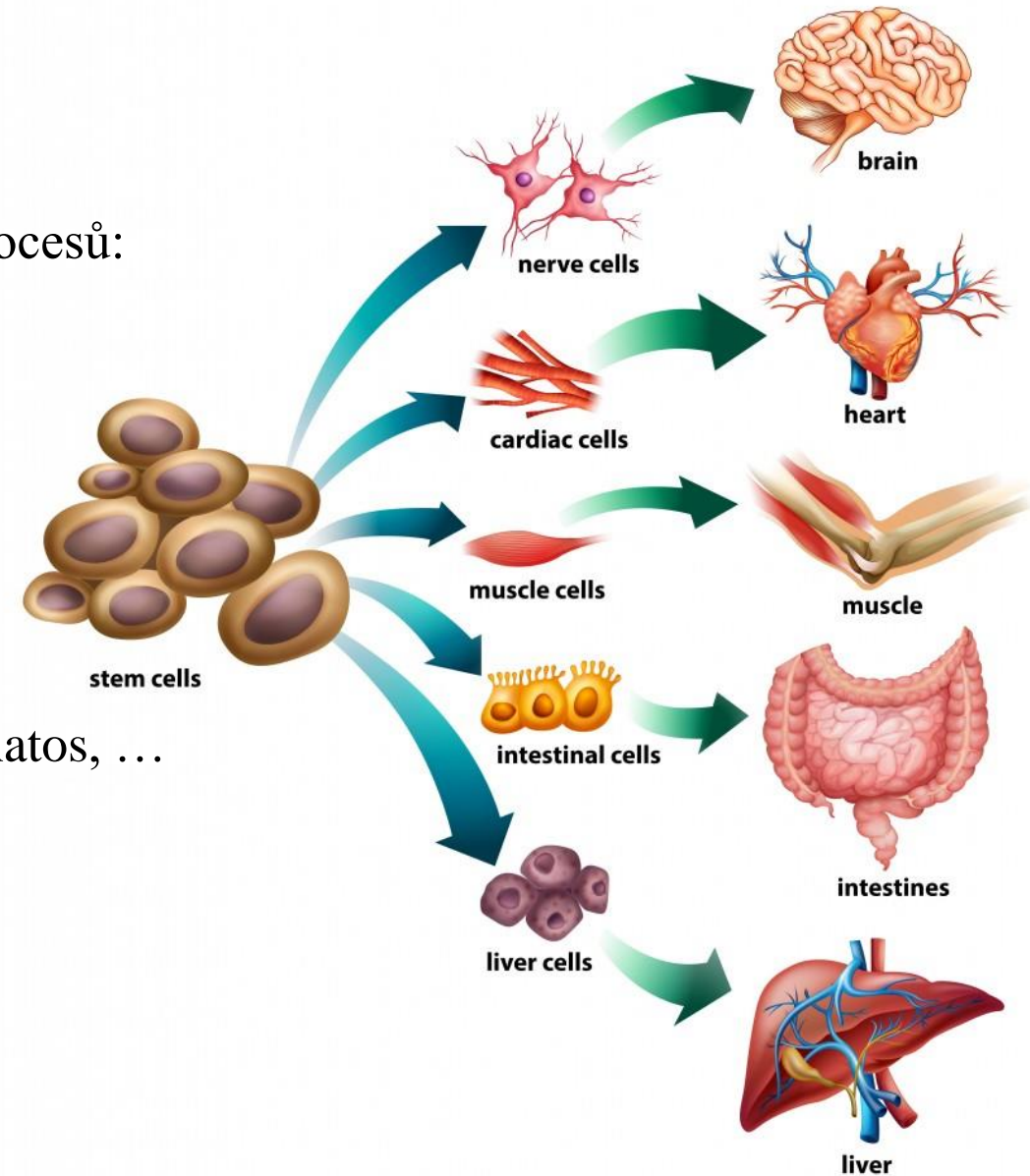
vývoj organismu se stává (na základě genetické informace) z procesů:

- proliferace
 - mitóza
 - meióza
- diferenciace
- zánik buněk
 - apoptóza (organizovaný zánik)
 - nekróza (neorganizovaný zánik)
 - nekroptóza, autofagie, ferroptóza, pyroptóza, Parthanatos, ...

nutnou podmínkou existence a fungování mnohobuněčného organismu je mezibuněčná komunikace

- se sousedními buňkami (parakrinní)
- s mezibuněčnou hmotou
- se vzdálenými buňkami (endokrinní)
- sama se sebou (autokrinní)

Various Potential Application of Stem Cells



Reprodukce buněk

- základní znak života
- nové buňky vznikají pouze dělením existujících buněk
- život každé buňky probíhá v **reprodukčních cyklech**:
 - **růst** (zdvojení všech buněčných struktur)
 - **dělení** (rozdělení genetického materiálu na dvě identické sady)
- reprodukce buněk zakódována v jejich genetické informaci – **tendence se neomezeně množit (reprodukovat)**
- **nutná regulace množení** pro udržení integrity organismu jako celku

Cíle reprodukce

- **reprodukce individua** – tvorba gamet při meióze
- **ontogenetický vývoj** – embryogeneze
- **udržení buněčné homeostázy** – regenerace poškozených a opotřebovaných buněk
- v organismu asi 10^{13} buněk, řada se jich stále obnovuje
(erytrocytů vzniká asi $2,5 \times 10^6$ za sekundu)
- porucha regulace vede k nekontrolovanému množení \Rightarrow **nádorový zvrát**

Buněčný cyklus

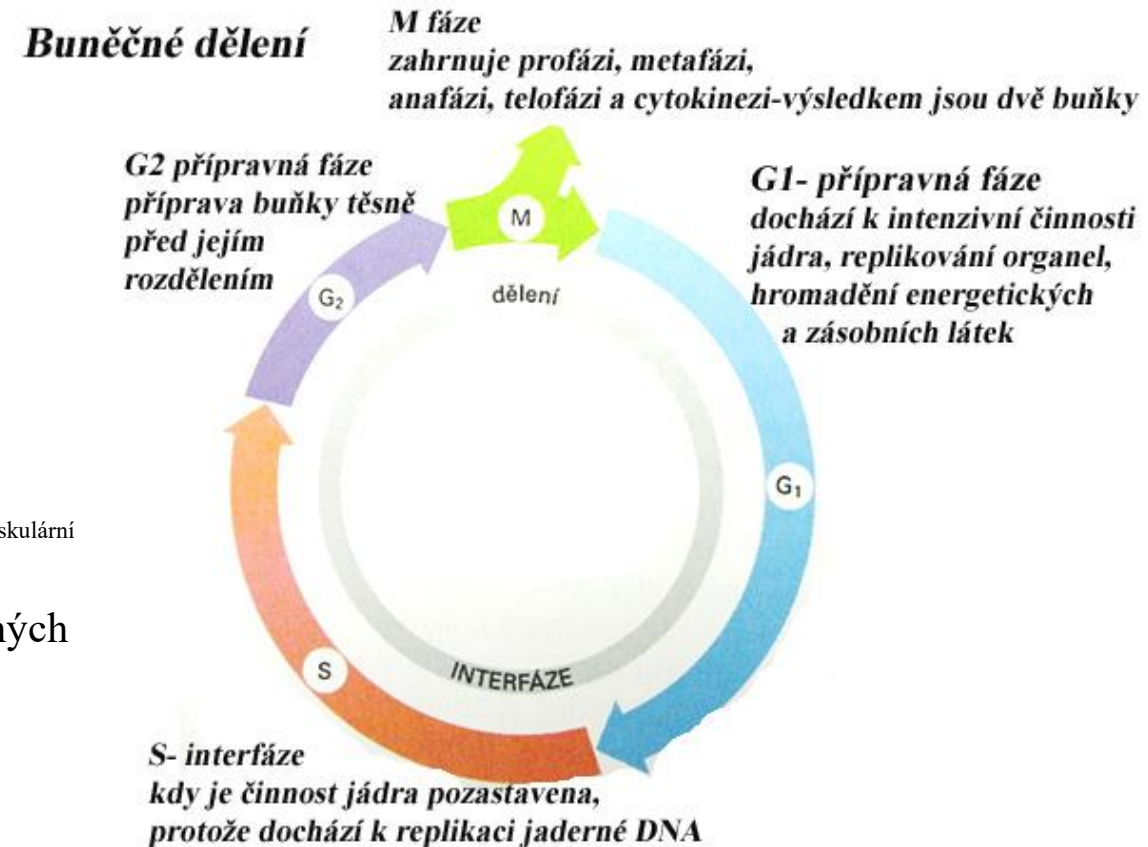
- je sled vzájemně koordinovaných událostí, které vedou k růstu a rozdělení buňky na 2 buňky dceřiné
- buněčný cyklus se dělí na:
 - **interfázi** (90 % buněčného cyklu), rozeznáváme G₁, S a G₂ fázi
 - **mitotickou fázi** (mitóza, M fáze)
- **generační doba buňky** = časový údaj o délce jednoho buněčného cyklu
 - **interfáze** je **variabilní** – především délka G₁ fáze
 - G₁ (gap) 30-40 %
 - S (synthesis) 30-50 %
 - G₂ (gap) 10-20 %
 - M (mitosis) 10 %

Buněčný cyklus

- buňky vyžralých (diferencovaných) tkání – neprobíhá buněčný cyklus, nachází se v klidové fázi (G0), buňky jsou plně **diferencovány** a každá plní specifické funkce
- diferencované buňky mohou pod vlivem mitogenních faktorů (růstových faktorů) opět vstoupit do buněčného cyklu a znovu se množit
- v jiných tkáních jsou přítomny **kmenové buňky** a populace nezralých mitoticky aktivních buněk, které zajišťují náhradu za odumřelé diferencované buňky (kůže)
- v G1 fázi se rozhoduje o tom, zda buňka vůbec vstoupí do dalšího cyklu (restrikční bod); to se stane pouze vlivem mitogenních faktorů; jinak buňka vyřazena z cyklu a vstupuje do G0 fáze, v níž buď pod vlivem diferenciačních faktorů vyžrává, nebo apoptózou zaniká

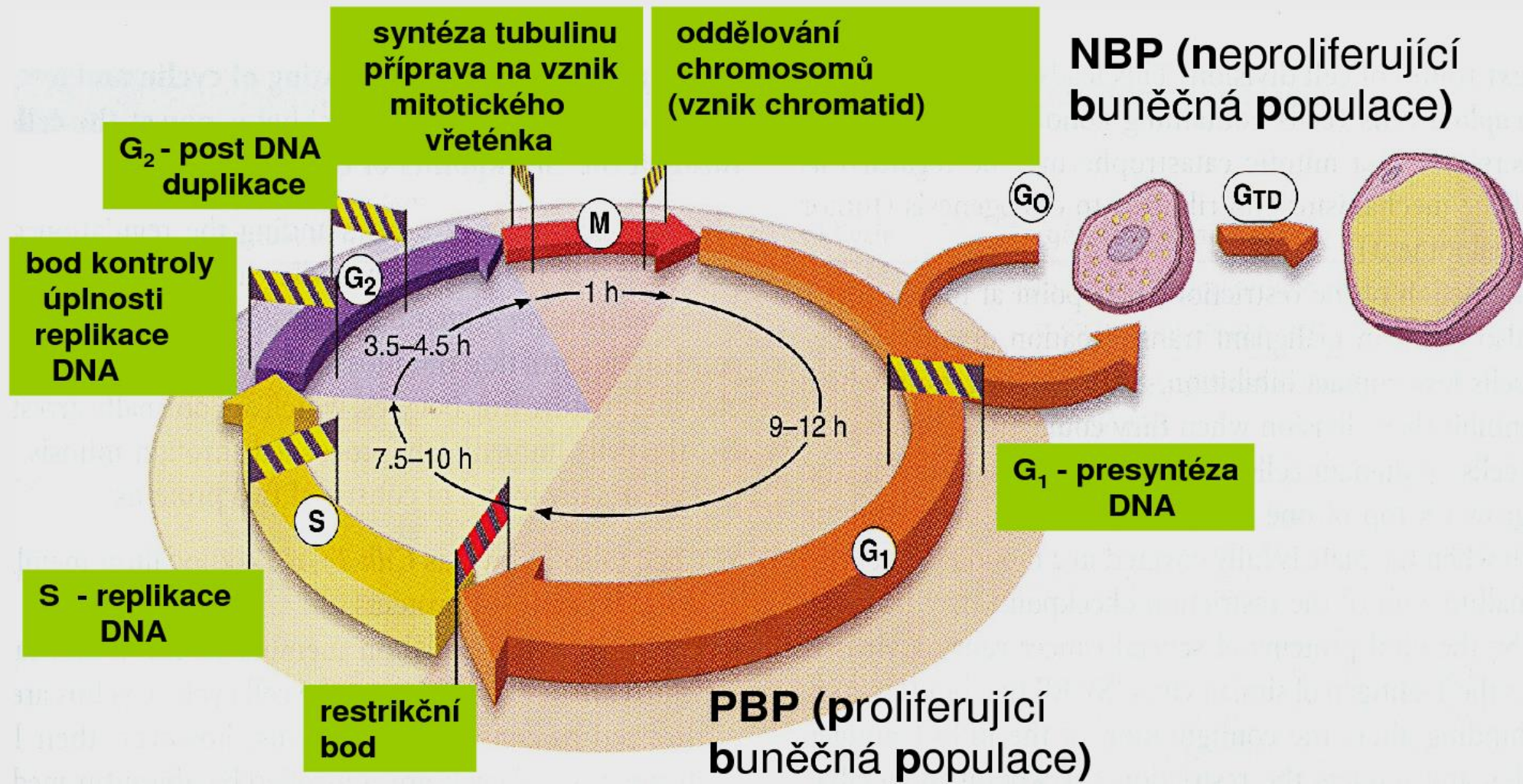
Regulace buněčného cyklu

- na rozdíl od jednobuněčných org. (kde dělení závisí na přísunu živin) je dělní u mnohobuněčného organismu vysoce regulovaný proces
 - podle potřeb organismu
 - růst
 - náhrada za ztracené buňky
 - nutné živiny + signály!
 - některé buňky v organismu se nedělí
 - jsou ve fázi G0 (následuje po G1)
- regulace cyklu
 - signály k dělní – růstové faktory
 - EGF(epidermální RF), TGF β (transformující RF beta), PDGF (destičkový RF), VEGF (vaskulární endotelový RF), bFGF (základní fibroblastový RF), ...
 - prostřednictvím vazby na receptor vedou k aktivaci/deaktivaci různých proteinů v buňce
 - cykliny
 - cyklin-dependentní kinázy
 - transkripční faktory
 - kontrolní body cyklu



SCHEMA BUNĚČNÉHO CYKLU

Restrikční uzlové body (branky) - pokračování umožňují
CYKLINY a CYKLIN-dependentní kinázy (CDK)



Regulační proteiny buněčného cyklu

(proto)-onkogeny

- Geny, které kódují proteiny podporující přežití buněk a komponenty molekulárních kaskád zprostředkovávajících signál „START“ v odpovědi na mitogenní signály.
- Abnormální, **mutované** formy těchto proto-onkogenů, které vedou k nadměrné buněčné proliferaci a nádorům, se nazývají **onkogeny**.

mutagens
carcinogens
viruses
irradiation
predisposition

Essential
cell functions

NORMAL
proto

TRANSFORMING
oncogene

oncogene

↓
altered
cell functions



nádorové supresory

- Proteiny kódované **nádorově supresorovými geny** inhibují buněčnou proliferaci nebo přežívání.
- Tumor supresorové proteiny inhibují stejné buněčné regulační dráhy, které jsou stimulovány produkty onkogenů.

Regulační proteiny buněčného cyklu

(proto)onkogeny

– (1) cykliny

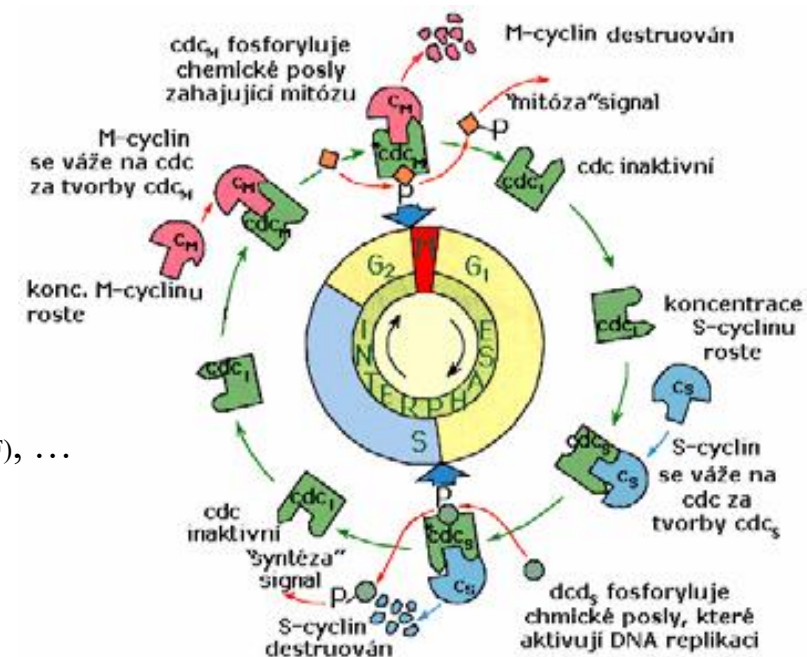
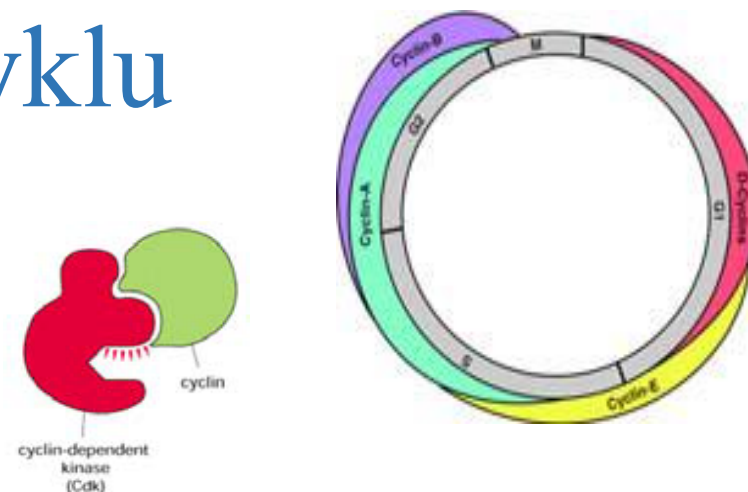
- 8 typů – A, B, C, D, E, F, G, H
- specifické pro jednotlivé fáze cyklu

– (2) cdk (cyklin dependentní kinasy, cyclin-dependent kinases)

- 9 typů: cdk-1 až cdk-9
- pouze komplex cdk s cyklinem je aktivní
- fosforylují seriny a threoniny cílových proteinů » aktivace (např. Rb-protein)
- součástí komplexů cyklin/cdk jsou inhibitory cdk (např. p21), teprve jejich proteolýza umožňuje aktivitu komplexu
- zatímco hladina cdk zůstává během cyklu v podstatě konstantní, exprese cyklinů se liší

– (3) růstové faktory (GF – growth factor) a jejich receptory

- GF působí ve velmi malých koncentracích, většinou parakrinně
- např. TGF- β (transformující RF), PDGF (destičkový RF), EGF (epidermální RF), VEGF (vaskulární endotelový RF), ...



Regulační proteiny buněčného cyklu

supresorové geny

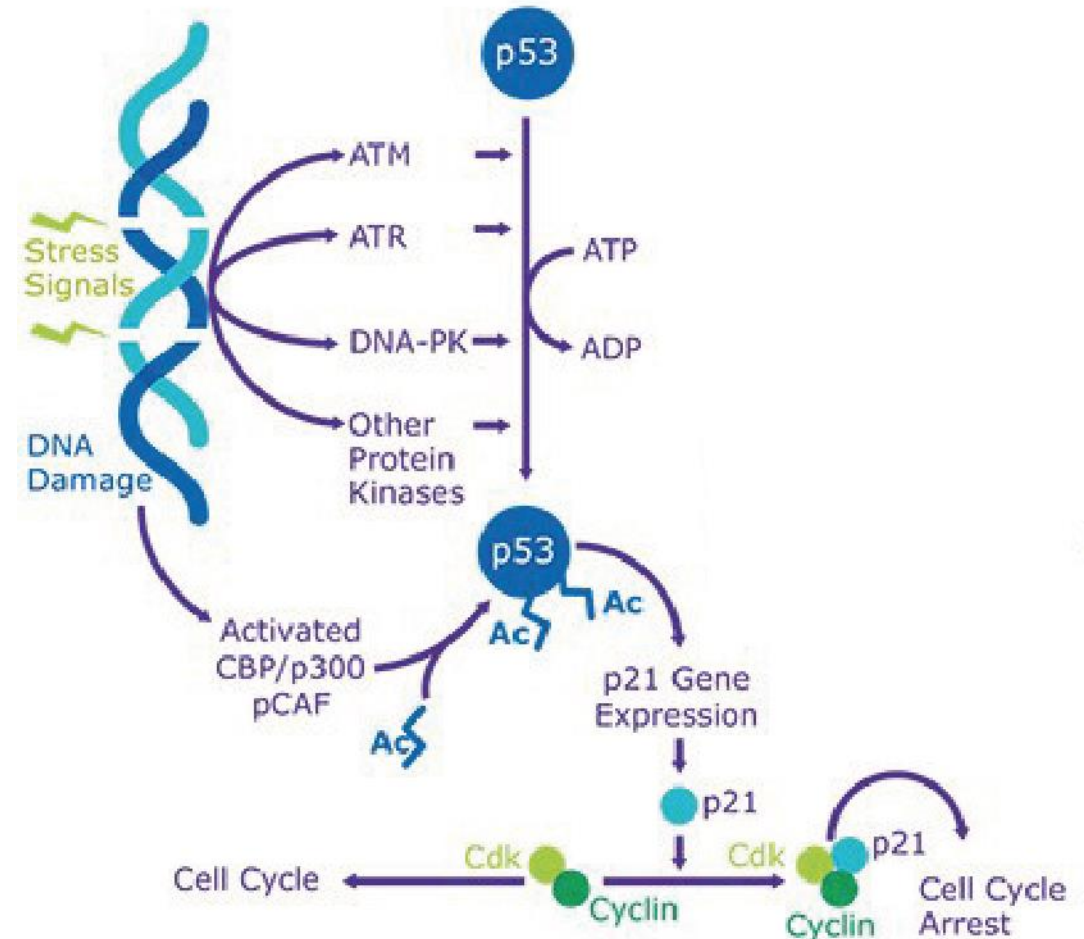
- velmi důležité jsou proteiny Rb a p53
- **(1) Rb protein** (ch. 13q14)
 - mutace Rb (nejčastěji mikrolece) vedou ke vzniku retinoblastomu (nádor sítnice)
- **(2) p53 protein** (ch. 17p13)
 - „strážce genomu“ – kontrola cyklu v G1 a G2 kontrolních bodech
 - při poškození DNA se zvyšuje exprese p53
 - funguje jako **transkripční faktor**
- mutace v supresorových genech jsou podkladem dědičných typů rakovin
- často názvy podle typu nádoru, který vzniká při jejich mutaci, např.
 - Rb (retinoblastom)
 - WT (Wilmsův tumor)
 - NF1 a NF2 (neurofibromatóza)
 - APC (adenomatózní polypóza coli)
 - VHL (von Hippel-Lindau syndrom)

Protein p53

při poškození DNA se aktivuje p53, který dále zprostředkuje:

- expresi inhibitorů b. cyklu (p21) → dočasné **zastavení b. cyklu** v G1/S kontrolním bodě, které umožní reparaci DNA
- zvyšuje expresi GADD 45 (Growth Arrest and DNA Damage) → **excizní reparace DNA**
- pokud není oprava úspěšná, zvyšuje expresi Bax → **apoptóza**

mutace p53 jsou přítomny cca u 50 % všech nádorů!!!



Dělení buněk

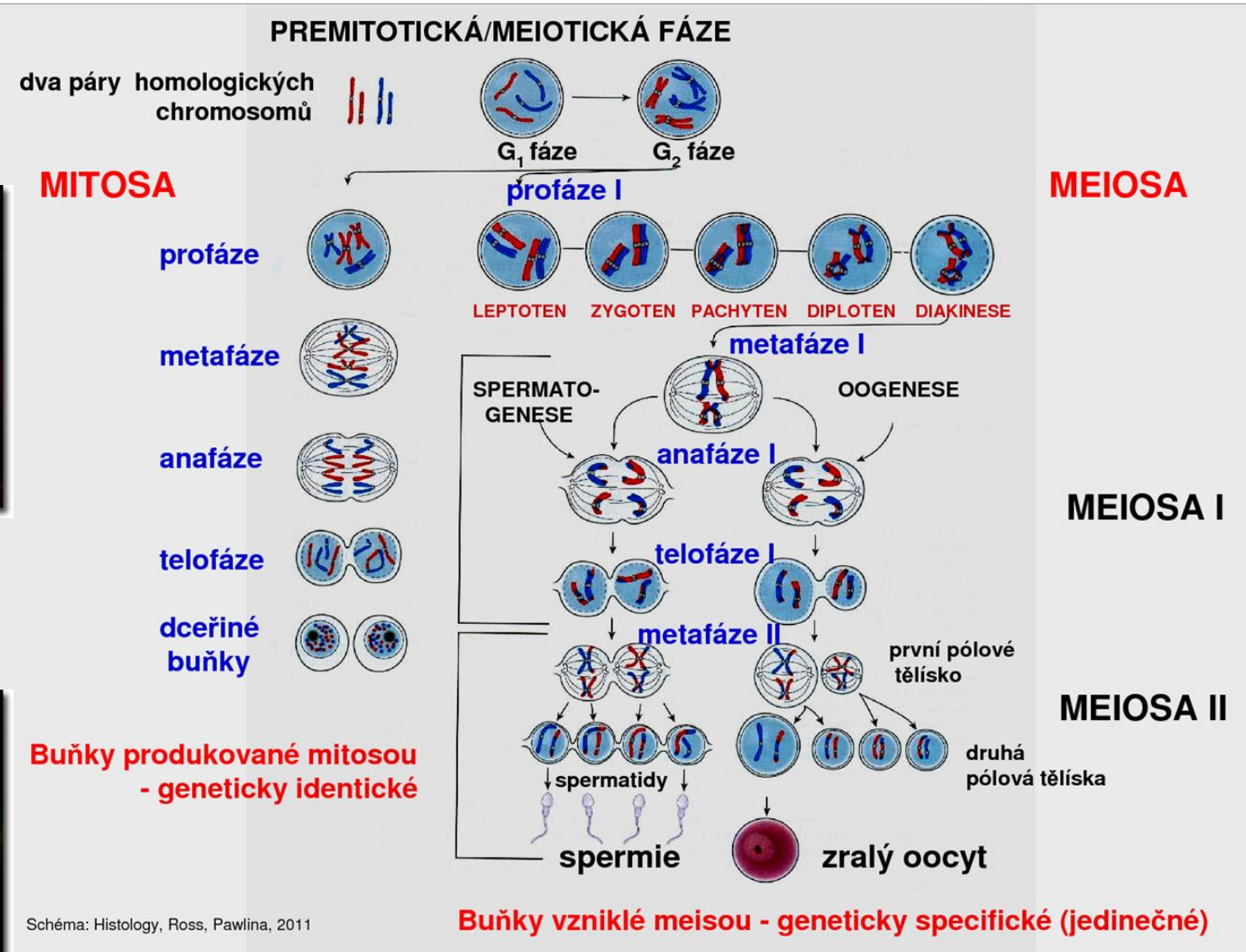
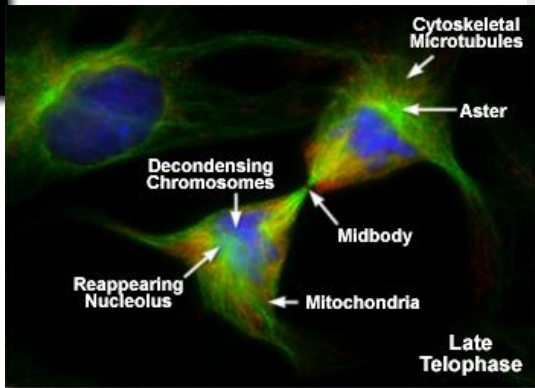
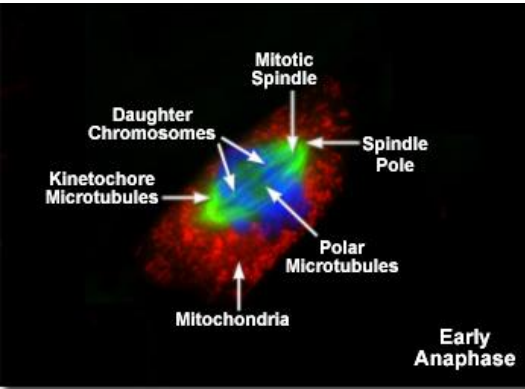
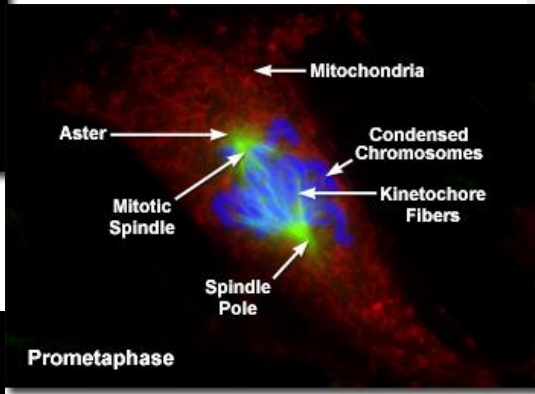
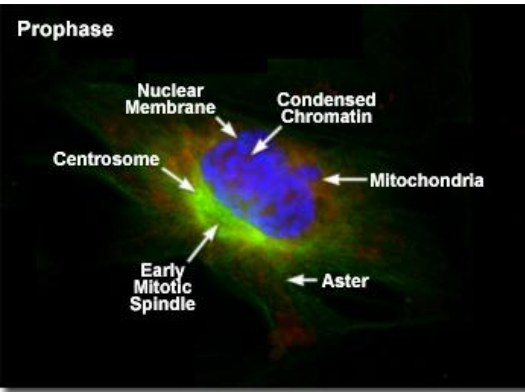


Schéma: Histology, Ross, Pawlina, 2011

Dělení buněk a jeho poruchy

- **Mitóza**

2 dceřiné buňky s diploidním počtem chromozomů

- **Meióza**

2 dceřiné buňky s haploidním počtem chromozomů

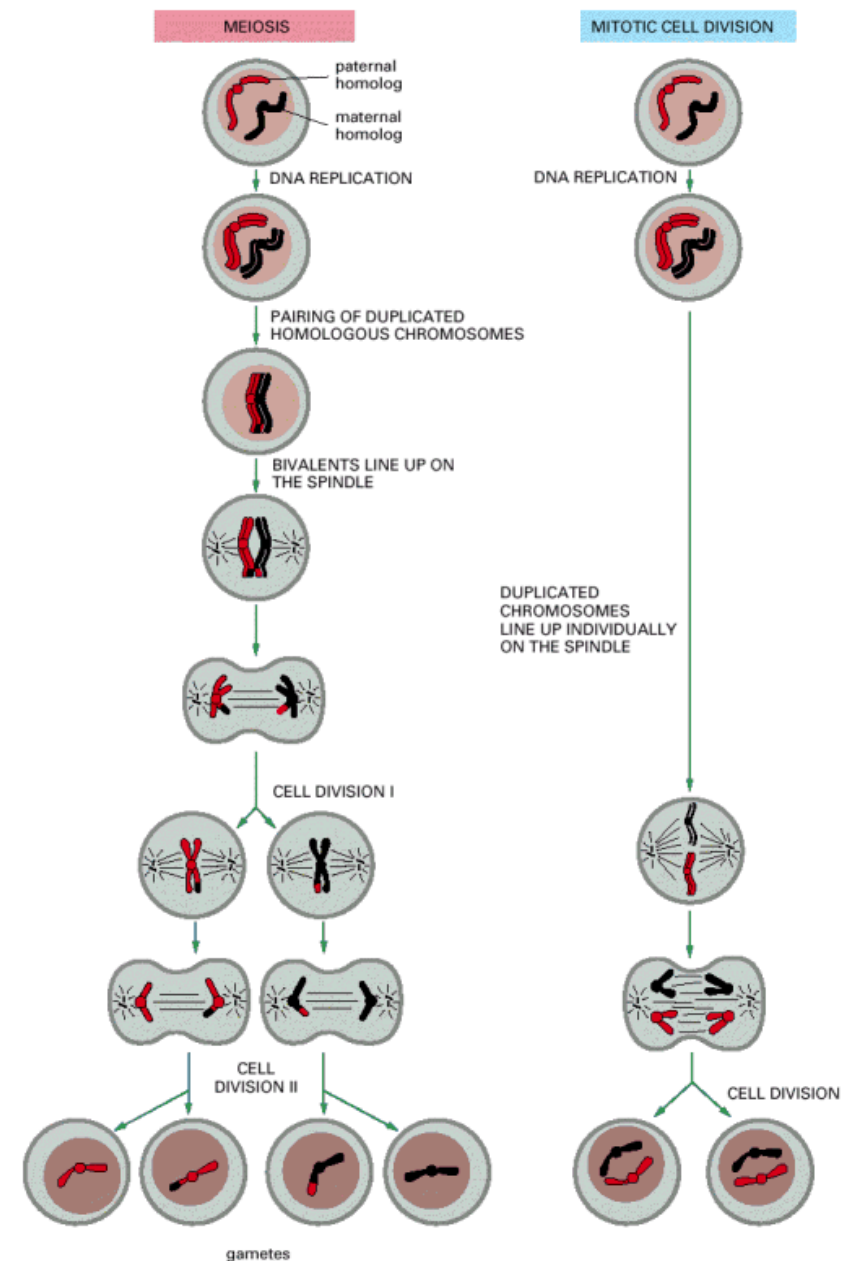
- vznik pohlavních buněk (spermie, vajíčko)

- **Poruchy**

– porucha rozdělení sesterských chromozomů = **aneuploidie** (změna počtu chromozomů v sadě)

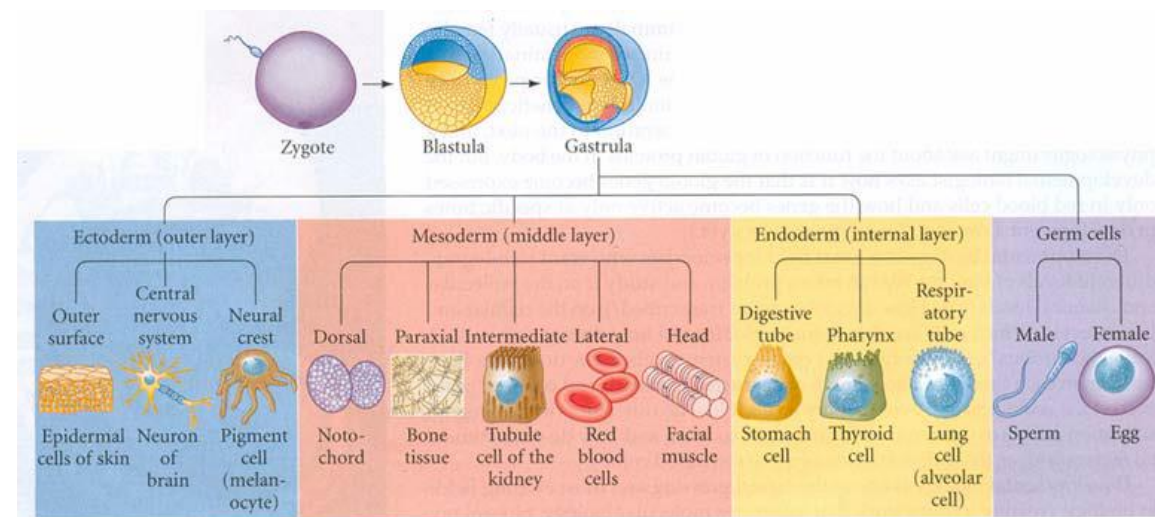
- monosomie
- trisomie (autosomů i gonosomů)
- Downův sy. (47, XX/XY + 21)
- Edwardsův sy. (47, XX/XY +18)
- Patauův sy. (47, XX/XY +13)
- Turnerův sy. (45, X0)
- Klinefelterův sy. (47, XXY)

– porucha rozdělení celých sad = **polyploidie** u člověka neslučitelné se životem

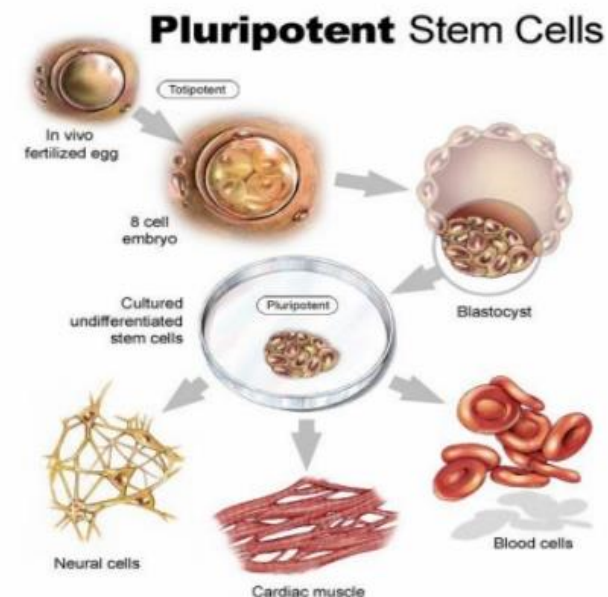


Diferenciace a její poruchy

- diferenciace = vyžívání k určitým úkolům na základě stimulace mimobuněčnými faktory (růst. faktory, cytokiny)
 - změna **genové exprese**
 - změna struktury
 - změna funkce
- pluripotentní kmenová buňka (PKB)
 - schopnost diferencovat se v jakoukoliv buňku daného orgánového systému (tj. “zásoba”)
 - funkčně plnohodnotná náhrada = **regenerace**
rychlá - pokožka, střevní epitel, krvetvorná tkáň, děložní sliznice
 - pokud není možnost – náhrada vazivem nebo glí = **reparace**



What is cell differentiation?



Transport iontů a nízkomol. látek přes membránu

• Pasivní

• prostá difuze

- nízkomolekulární látky bez náboje
 - O_2 , CO_2 , NO , voda (osmotický tlak), močovina, etanol
- nevyžaduje energii, rozhodující je koncentrační gradient

• facilitovaná (usnadněná) difuze

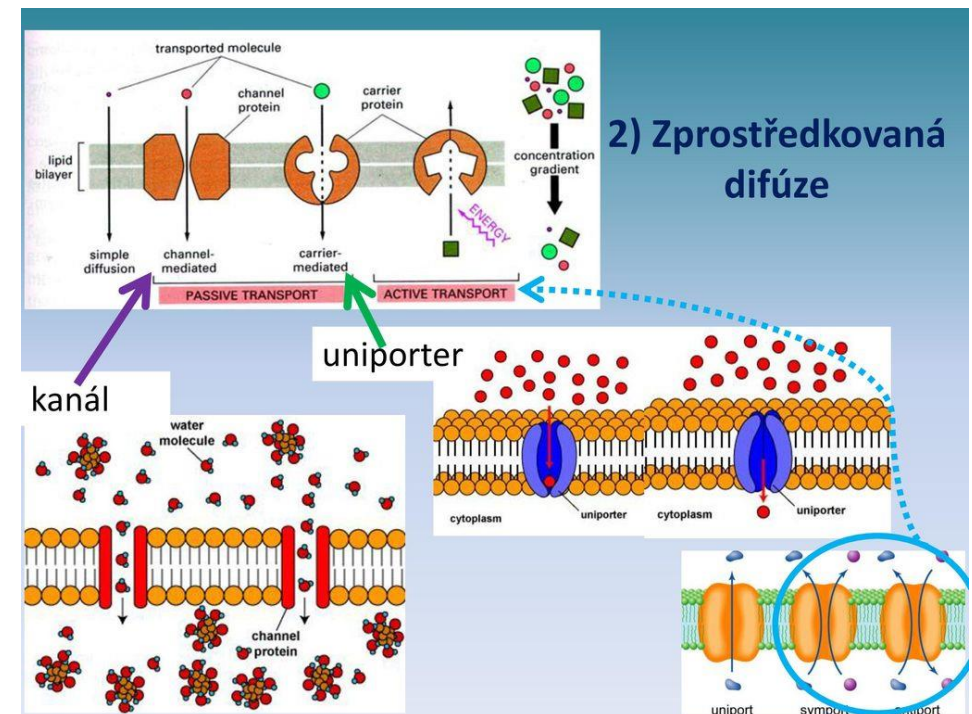
- uniport
 - podle koncentračního gradientu, nevyžaduje energii
 - nutné specifické nosiče (= saturovatelnost) » glukóza a jiné cukry
- symport/antiport
 - přenos látek proti koncentračnímu gradientu → energii dodává gradient Na^+ » glukóza, aminokyseliny, Ca^{2+}

• iontové kanály

- buněčná membrána je prakticky neprostupná pro ionty
- tok podle elektrochemického gradientu
- vrátkování („gating“)
 - elektrické
 - ligandem
 - mechanické
 - změny koncentrace Ca^{2+} a H^+ („gap junctions“)
- podmiňují membránový potenciál

• Aktivní = pumpy

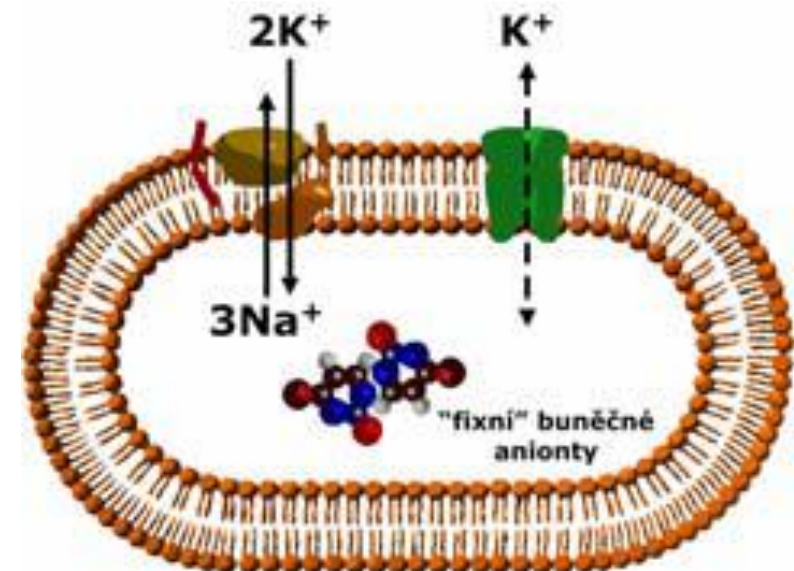
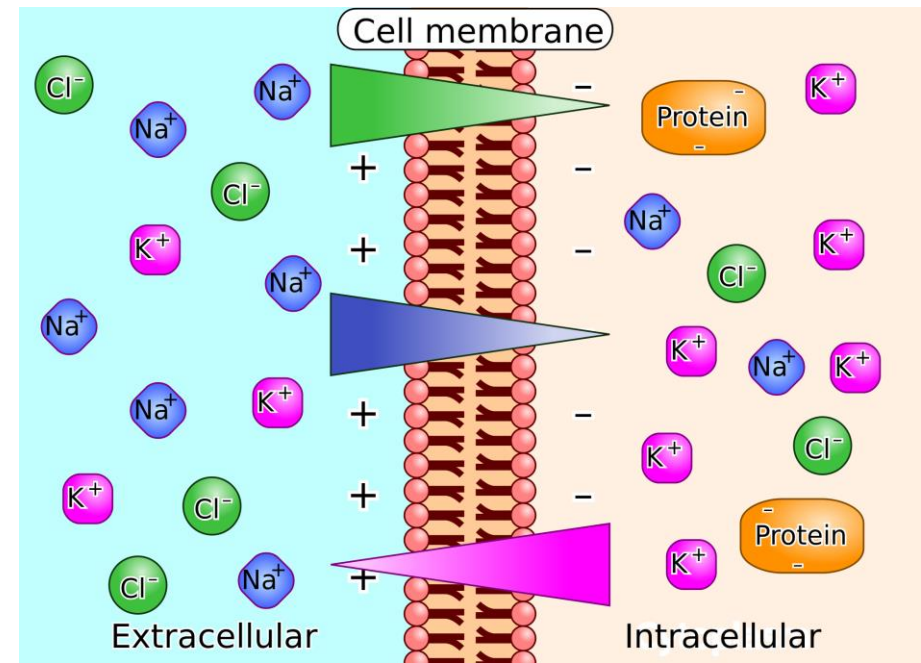
- energie z ATP
- nutný k udržení membránového
- napětí a buněčného objemu, vytváří Na^+ gradient pro symporty a antiporty
 - Na^+/K^+ -ATPasa
 - Ca^{2+} -ATPasa
 - H^+ -ATPasa



2) Zprostředkovaná difuze

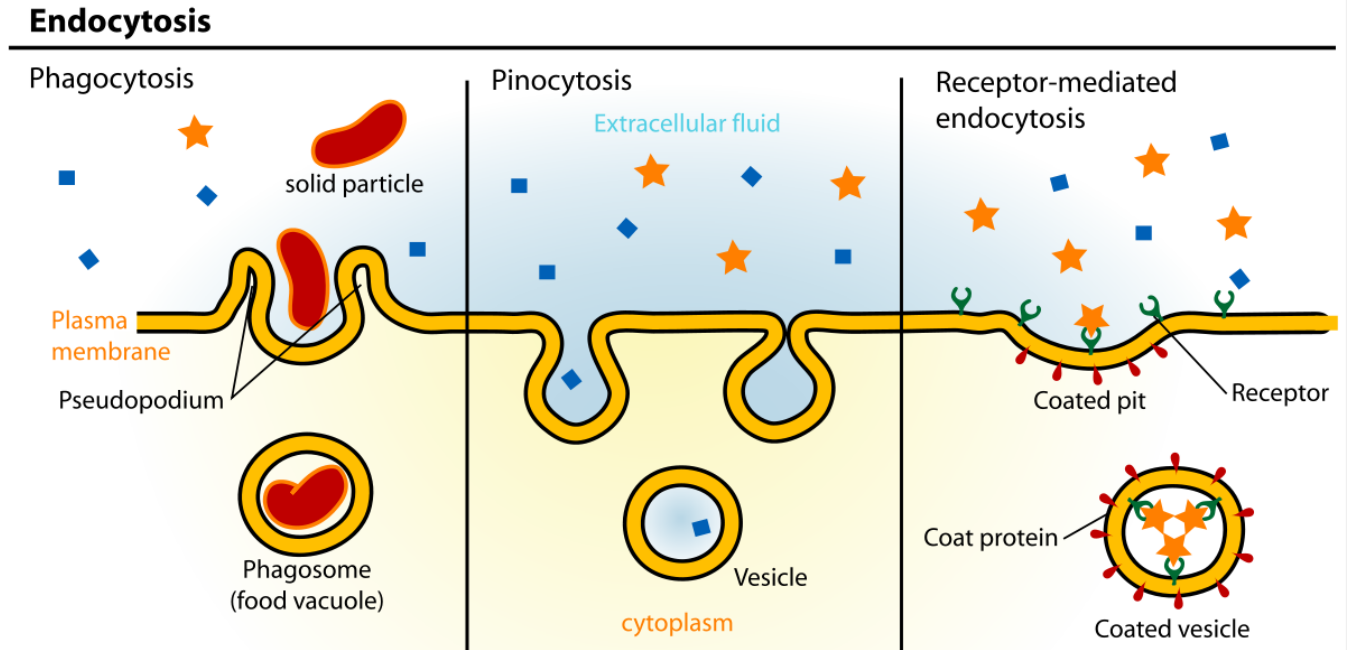
Membránový potenciál

- způsoben rozdílem nábojů na obou stranách membrány
- určen 4 hlavními ionty
 - Na^+ , K^+ , Cl^- , organické anionty
 - uvnitř buňky záporný náboj jako výsledek
 - existence “fixních” intracelulárních aniontů - buněčné proteiny
 - činností elektrogenní Na^+/K^+ ATPasy
 - přesun kationtů v poměru
 - 3 Na ven : 2 K dovnitř
 - nutný pro excitabilitu tkání



Transport vysokomolekulárních látek přes membránu

- sekrece/pohlčení proteinů
 - endo-/exocytóza
 - specializované proteiny
 - za účasti Ca^{2+}
 - pinocytóza
 - ve vodné fázi
 - fagocytóza
 - pomocí receptorů ve specializovaných buňkách



Typy buněčné komunikace

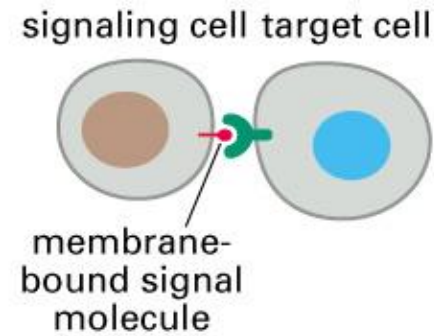
Přímým kontaktem

- spojovacími komplexy (nexy)
- kontaktem molekul na površích buněk (embryonální indukce a imunitní systém)

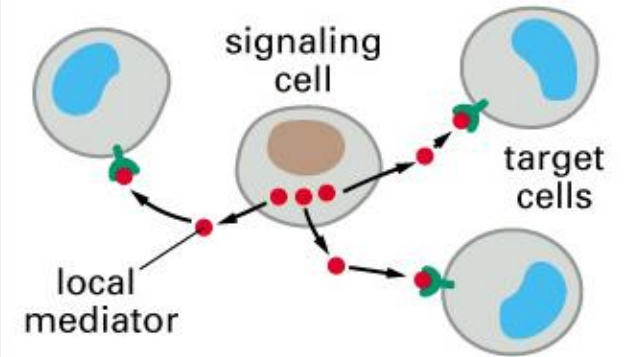
Prostřednictvím vylučovaných molekul

- **parakrynní** - chemické mediátory ovlivňují buňku pouze v nejbližším okolí
- **autokrynní** - buňky vysílají signály pro buňky stejného typu (mohou přijímat své vlastní signály)
- **synaptická** přenos neurotransmitérů v synapsích, v podstatě parakrynní
- **vzdálená - hormonální (endokrynní)** – hormony do krve, specifická, relativně pomalá

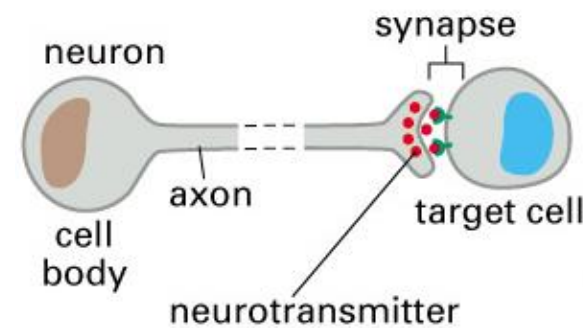
(A) CONTACT-DEPENDENT



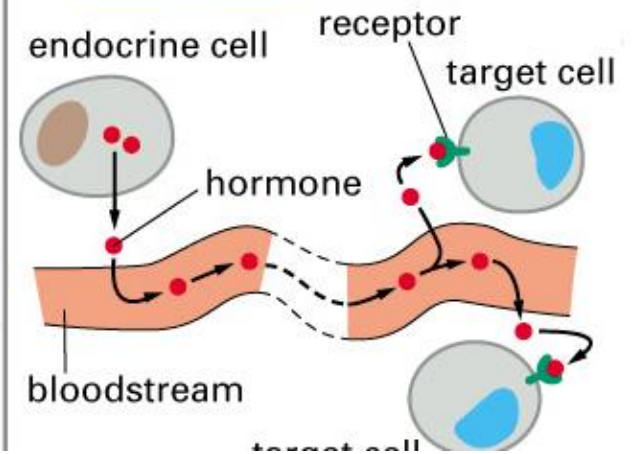
(B) PARACRINE



(C) SYNAPTIC

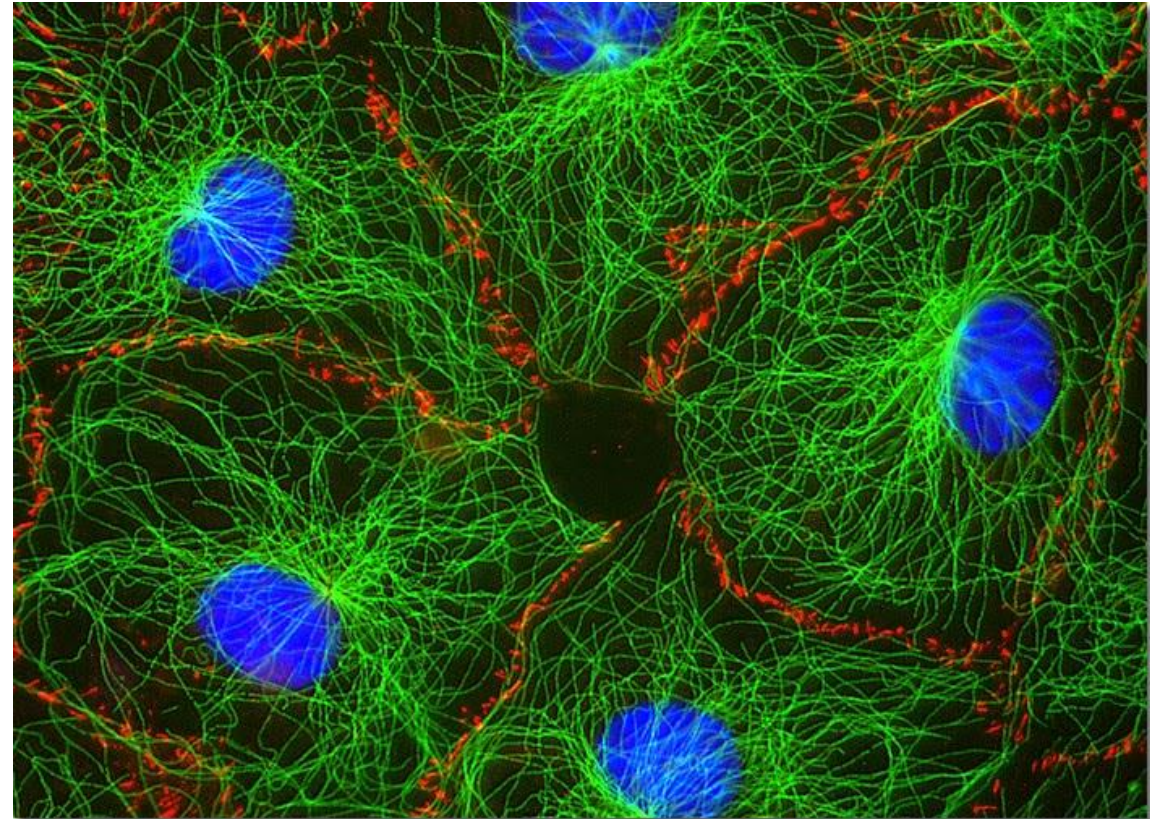


(D) ENDOCRINE

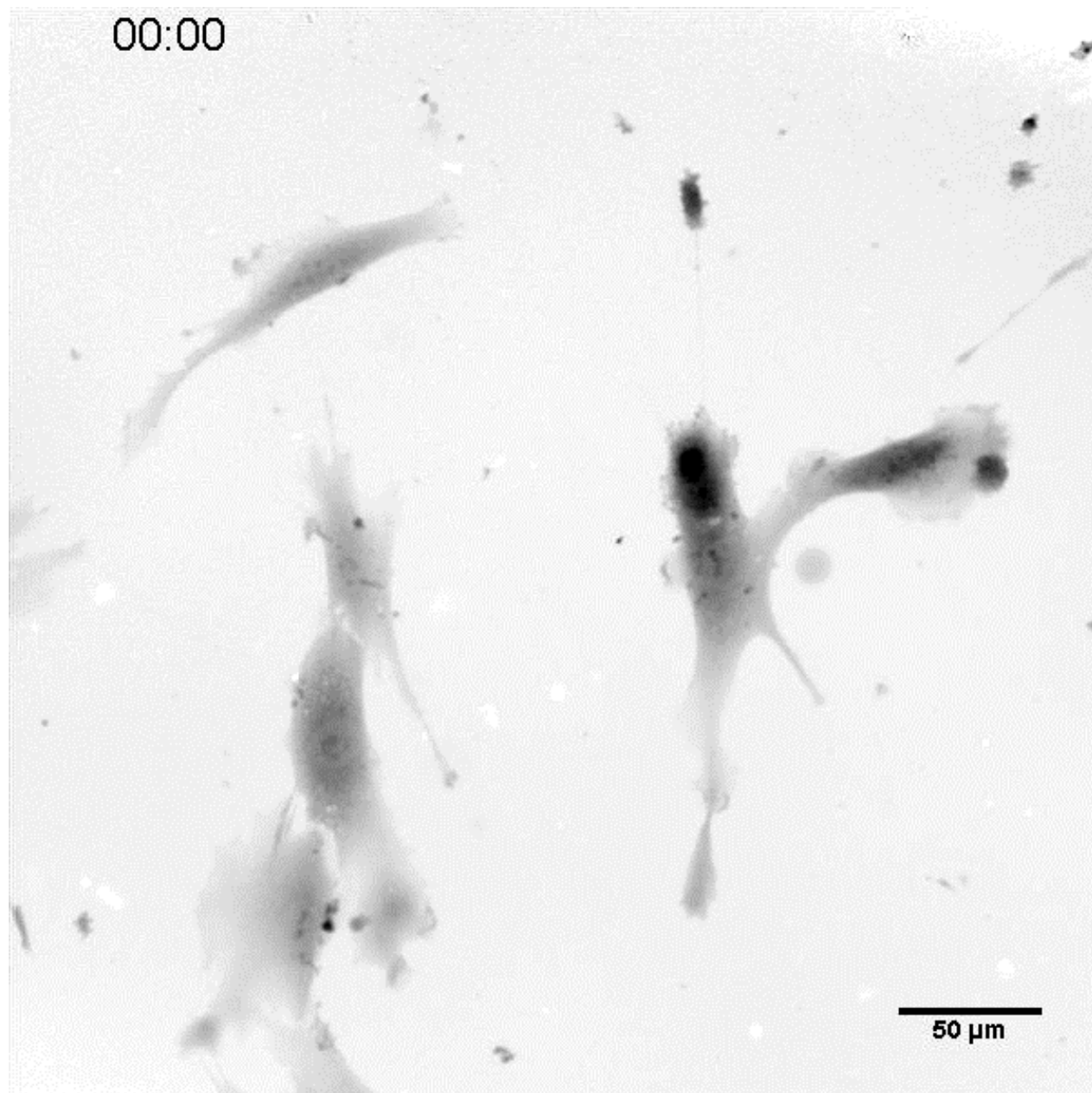


Mezibuněčná komunikace - přímým kontaktem

- komunikace buněk se sousedními, vzdálenými buňkami a s mezibuněčnou hmotou prostřednictvím:
 - adhezivních proteinů:
 - **integriny** (α - a β -podjednotky)
 - spojení epitelových buněk k bazální membráně
 - **adheziny**
 - podobné imunoglobulinům (CD4, CD8, TCR)
 - ICAM (InterCellular Adhesion Molecule)
 - VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule)
 - PECAM (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule)
 - NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule)
 - **selektiny** (ligandy pro integriny)
 - E-selektin - endotel
 - L-selektin - leukocyty
 - P-selektin - destičky
 - **kadheriny** (Ca^{2+} -dependentní transmembránové molekuly)
 - prostřednictvím kateninů vázány k cytoskeletu
 - membránových a nitrobuněčných receptorů pro cirkulující ligandy
 - neurotransmitery
 - hormony
 - transmembránové
 - intracelulární
 - cytokiny
 - růstové faktory
 - mezibuněčných spojů („tight/gap junctions“)



00:00

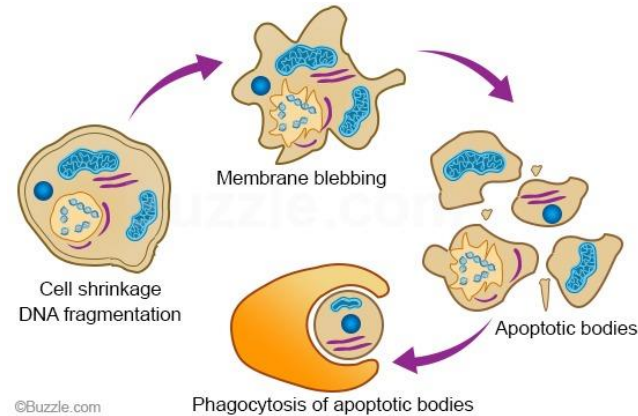


50 μm

Buněčná smrt – apoptóza, nekróza, nekroptóza

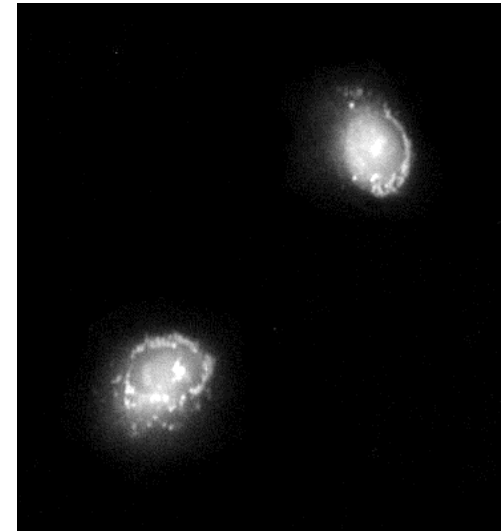
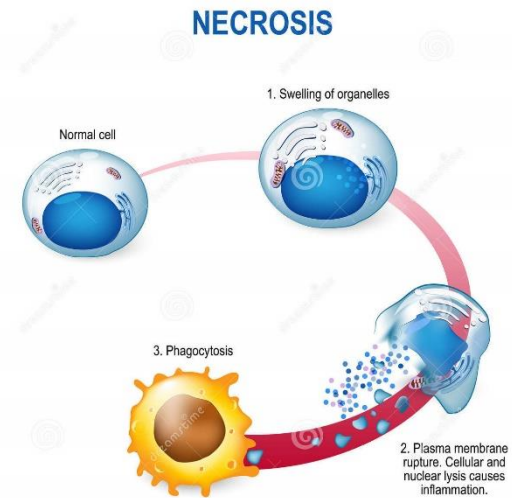
Apoptóza

Aktivní (= spotřeba energie) programovaná buněčná smrt. Aktivita kaspáz a dalších apoptotických enzymů (proteáz a nukleáz) vede k fragmentaci buňky do apoptotických tělísek, která jsou následně odstraněna makrofágy.



Nekróza

Náhodná buněčná smrt způsobená převážně vnějšími faktory (infekce, toxiny apod.). Buněčný obsah je vypuštěn do prostředí a poškozuje okolní tkáň. Nekróza podporuje vznik zánětu a nádorů.



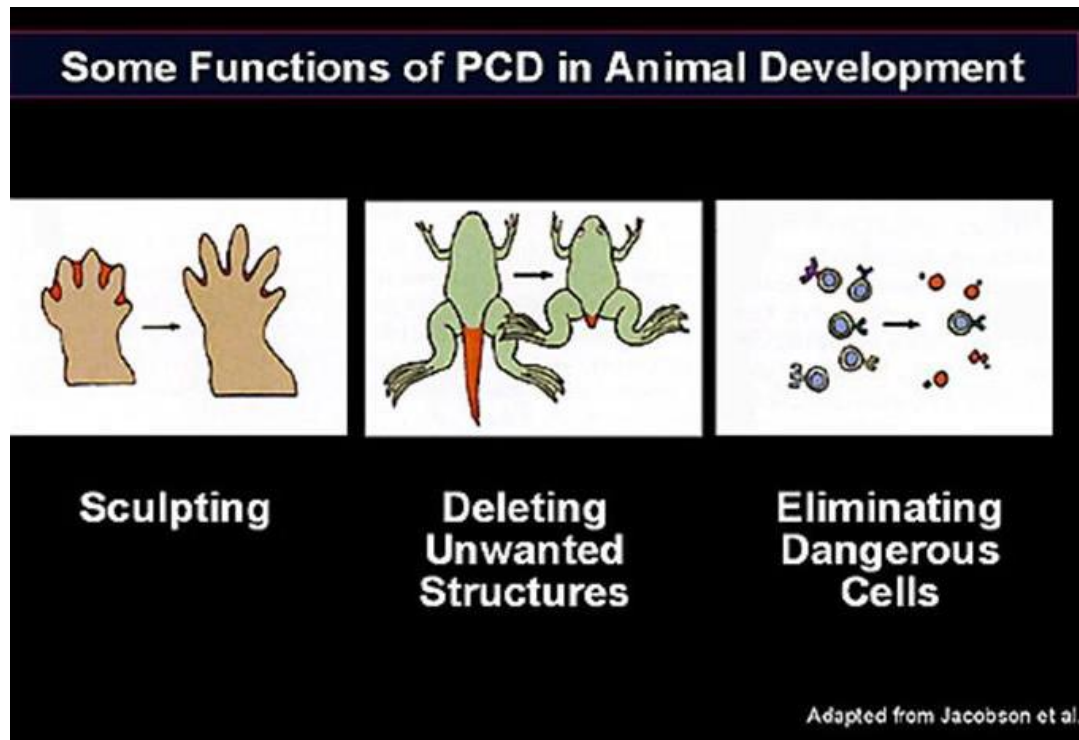
Nekroptóza

Kontrolovaná forma nekrózy řízená kinázami RIP1 a RIP3.

Význam apoptózy

- **kontrola nadměrné proliferace:** koordinační role při formování orgánů a tkání eliminace přestárých buněk
- **eliminace poškozených nebo geneticky aberantních buněk** (reakce na silné, neopravitelné poškození genomové DNA, extrémní kyslíková deprivace, významná signální nerovnováha, apod.)

Apoptóza a formování tkání



Apoptózou jsou během morfogeneze odstraňovány nežádoucí buňky – tvorba funkčních tkání a orgánů

Geneticky pozmeněné myši, které postrádají klíčové složky apoptotického aparátu vykazují typické vývojové poruchy: nadbytek neuronů v mozku, obličejové abnormality, poruchy formování prstů, atd.

Apoptóza a fyziologie tkání

- Tenké střevo: epiteliální buňky jsou apoptózou průběžně eliminovány po 4-5denní pouti ze spodních částí krypt do výběžků střeva
- Tvorba erytrocytů: více než 95 % erytroblastů je odstraněno apoptózou v kostní dřeni. Blokování apoptózy nastává v případě nedostatku kyslíku (nízký tlak kyslíku, anémie, krvácení) díky zvýšené produkci erythropoietinu

Kinetika buněčných změn během apoptózy

Přesná koordinace

1. tvorba vychlípenin plazmatické membrány (povrch buňky „vaří“)
2. jádro se zahušťuje a fragmentuje (stádium „pyknózy“)
3. chromozomální DNA se štěpí na krátké segmenty
4. během hodiny se apoptotická buňka rozpadá na malé části (**apoptotická tělíška**), která jsou pohlcena sousedními buňkami nebo makrofágy fagocytózou

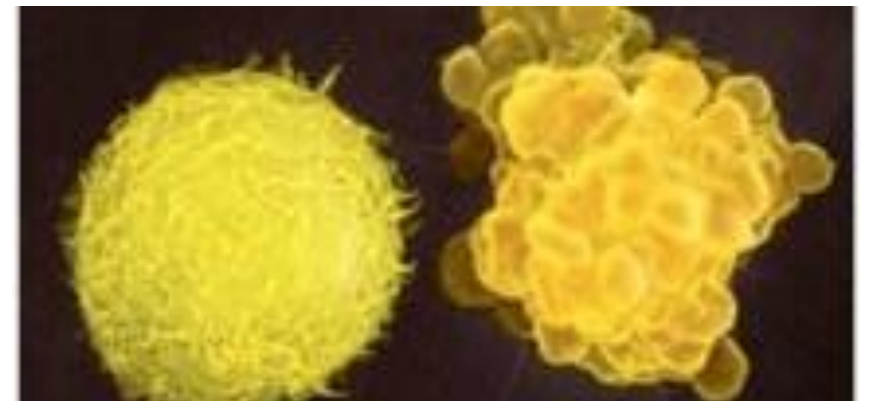
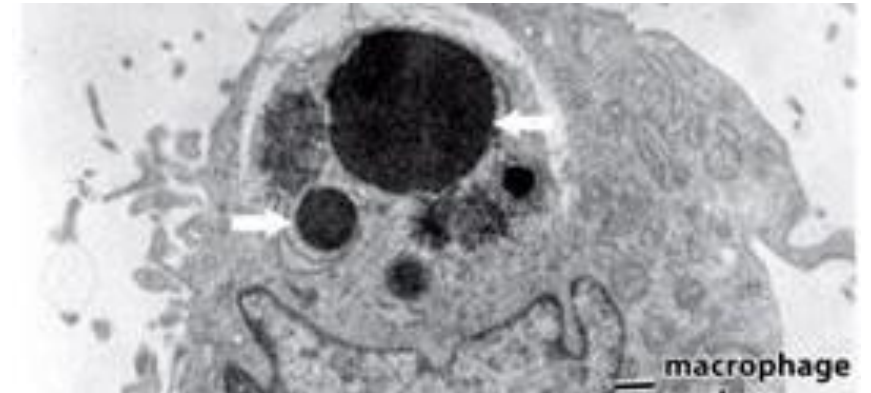
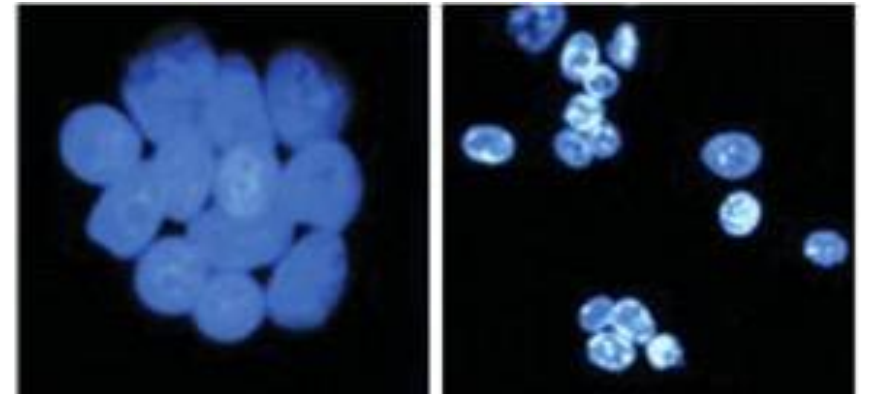
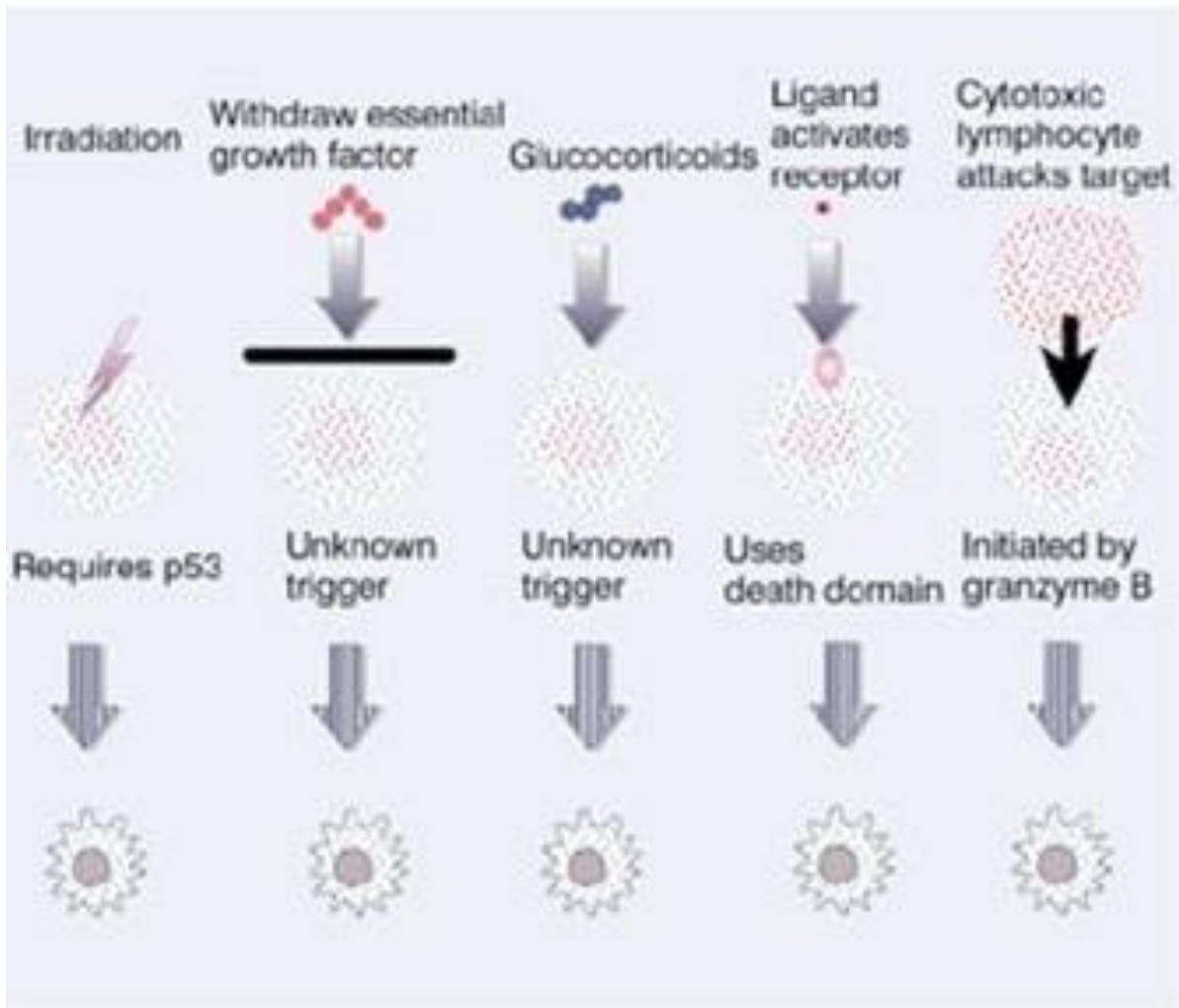


Figure 27.36 Apoptosis is triggered by a variety of pathways.



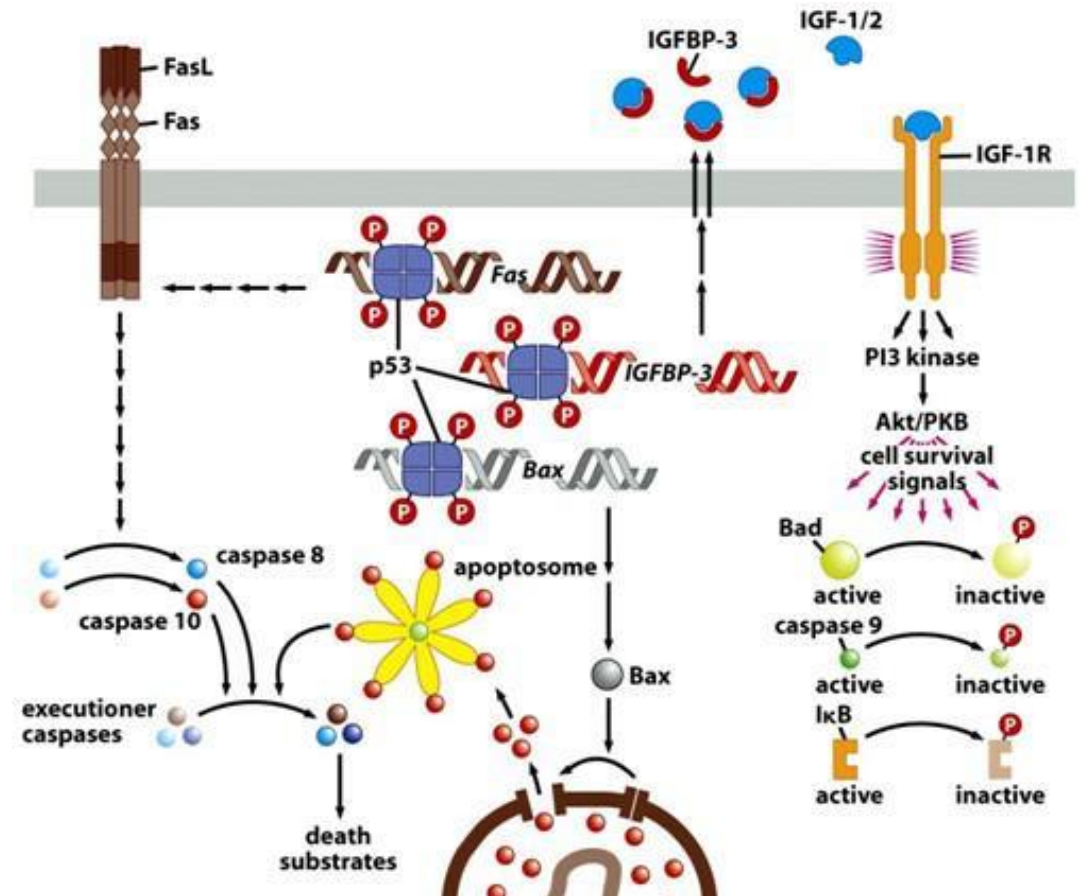
Pro-apoptické stimuly (signály smrti)

- UV a ionizující záření
- nedostatek růstových faktorů
- glukokortikoidy
- specifické ligandy (Fas, TNF = tumor necrosis factor)
- cytotoxické lymfocyty atakující své cíle
- exprese některých onkogenů a nádorových supresorů (p53, Rb)

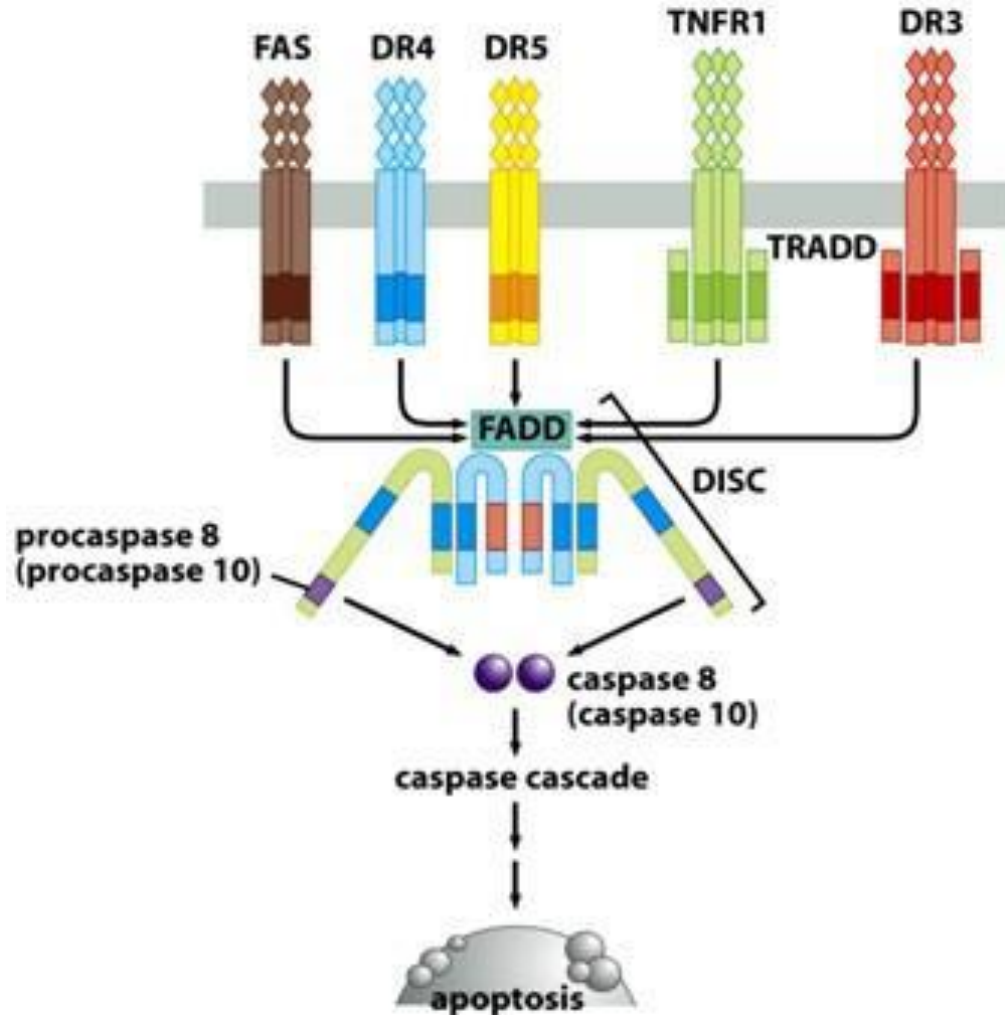
Apoptózu spouštějí dvě signální dráhy: vnitřní a vnější

Vnitřní dráha je závislá na p53

- poškození DNA, nedostatek růstových faktorů a další podněty mohou indukovat apoptózu zprostředkovanou p53
- p53 se podílí na:
 - aktivaci exprese bax, který kóduje pro-apoptotický protein uvolňující cytochrom c z mitochondrií a zajišťuje tak aktivaci kaspáz 9 a 3
 - aktivaci exprese genu kódujícího Fas receptor, tím zvyšuje citlivost buňky k FasL
 - aktivaci exprese genu pro IGF-binding protein 3 a jeho uvolnění do mimobuněčného prostoru, kde vychytává IGF-1 a IGF-2 (anti-apoptotické ligandy)
 - inaktivaci anti-apoptotického faktoru Smac/DIABLO 1.



Vnější dráha je závislá na povrchových receptorech smrti



- receptory smrti jsou transmembránové proteiny schopné vyvolat apoptózu
- receptory jsou závislé na vnějších ligandech
- napojují se na vnitřní (kaspázovou) signalizaci
- stejné projevy jako u vnitřní dráhy

Nádorové buňky se neřídí regulačními signály pro buněčnou smrt

- zdravé buňky mohou žít jen za přítomnosti růstových faktorů, jinak odumírají apoptózou × nádorové buňky přežívají i bez růstových faktorů
- zdravé buňky s poškozenou DNA odumírají apoptózou × nádorové buňky přežívají i s poškozenou DNA
- rezistence k apoptóze je jedním z důvodů prodloužené životaschopnosti nádorových buněk

Apoptóza a nádory

- zvýšená exprese bcl-2 zaznamenána u různých pevných nádorů, leukémií i lymfomů
- zvýšená exprese bcl-2 je nepříznivý faktor: zvýšená odolnost na chemoterapii
- terapie zaměřené na ovlivnění apoptózy se mohou uplatnit při léčbě některých nádorových i nenádorových chorob



Nádory (tumory)

Nádor je patologický stav (nemoc) v důsledku porušené kontroly buněčného dělení

– příčinou porušené regulace je genetická změna nejčastěji 1 somatické (ale i germinativní) buňky

– buňky vycházející z patologického klonu se nekontrolovaně množí (různě rychle) a posléze se šíří na další místa (rozvoj metastáz)

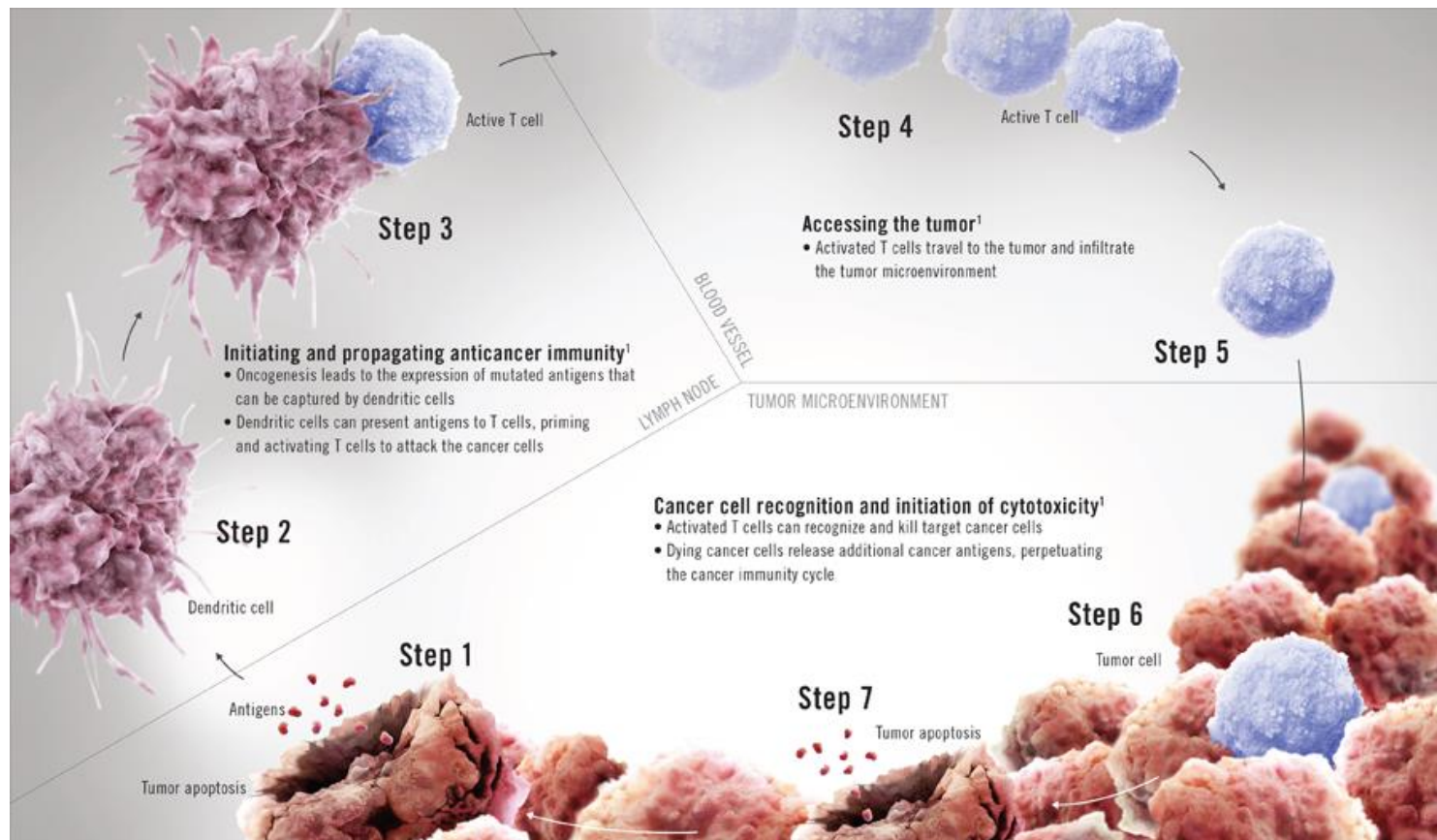
- **benigní** – mohou být hyperplastické nebo metaplastické; hyperplastické jsou tvořeny normálními buňkami v nadměrném množství, metaplastické obsahují normální buňky určitého typu které se však nachází v netypických lokalitách, zachovávají si diferenciaci
- **maligní** – nádory narušující bazální membránu a invadující tkáň pod ní, jsou dediferencované, mohou metastazovat

Nádory (tumory)

Všechny nádory jsou důsledkem genetické poruchy, a to klíčových genů kontroly buněčného cyklu

- **(proto)onkogenů** – normálně podporují dělení a růst buněk, pokud mutovány dělení je nekontrolované
 - **supresorových genů** – normálně kontrolovaně potlačují dělení, pokud mutovány, umožňují nekontrolované dělení
 - **DNA reparačních genů** – normálně opravují DNA opravitelné změny, pokud mutovány neopravená změna může být přenesena do dceřiných bb.
- většina nádorů jsou náhodné, tzv. sporadické = mutace v somatické buňce
- pouze některé jsou ovšem zároveň dědičné (tzv. familiární) = mutace v germinativní buňce

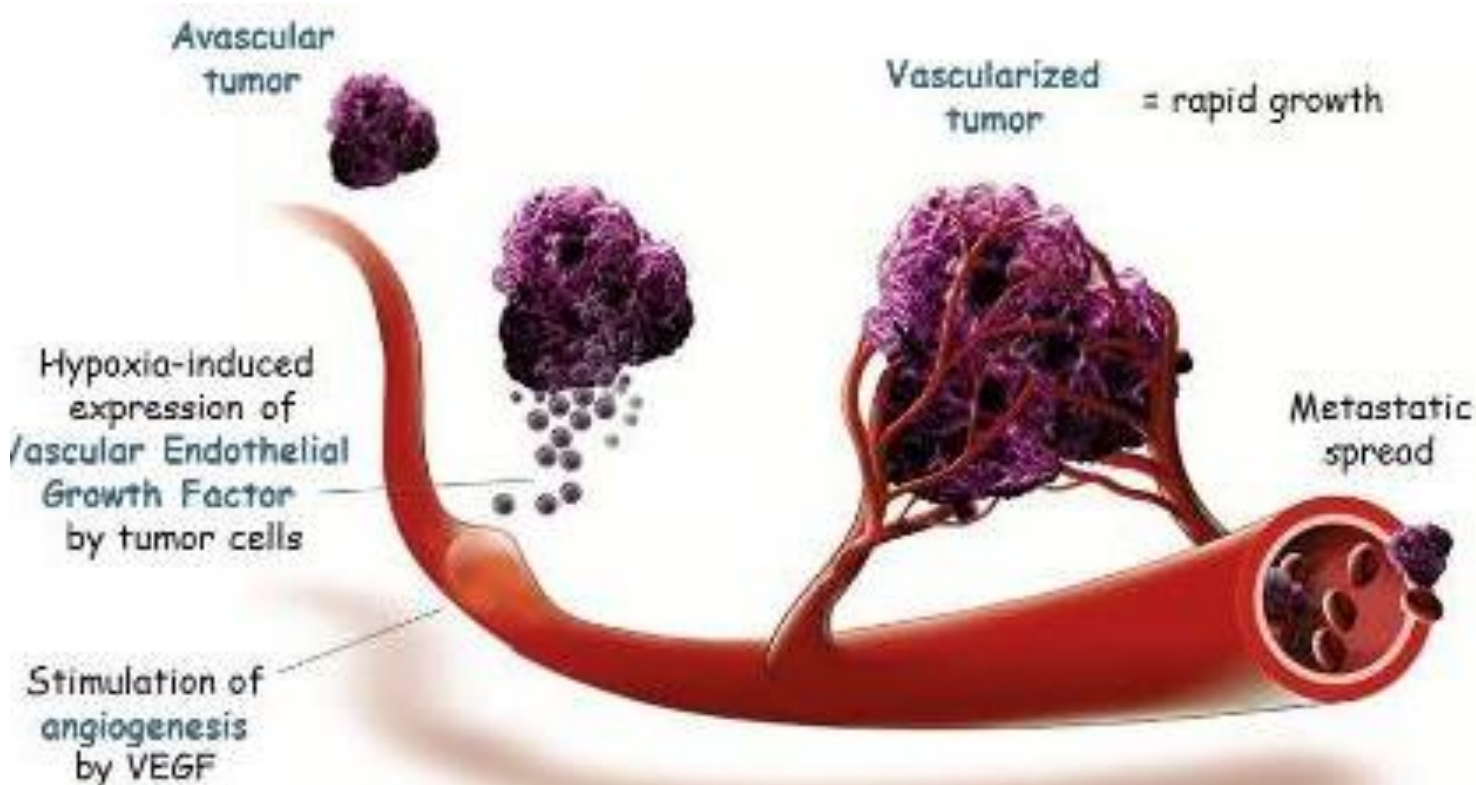
Imunitní systém vs. nádory



- nádorové bb. mají některé imunologické odlišnosti
 - změny přirozených povrchových antigenů (např. **ztráta MHC**)
 - unikají imunitnímu rozeznání a likvidaci
 - exprese nových (tzv. **onkofetálních**) antigenů
 - diagnostické markery (např. CEA, α -fetoprotein aj.)
- v protinádorové imunitě se uplatňují cytotoxické mechanismy
 - CD8⁺ T-lymfocyty
 - NK bb

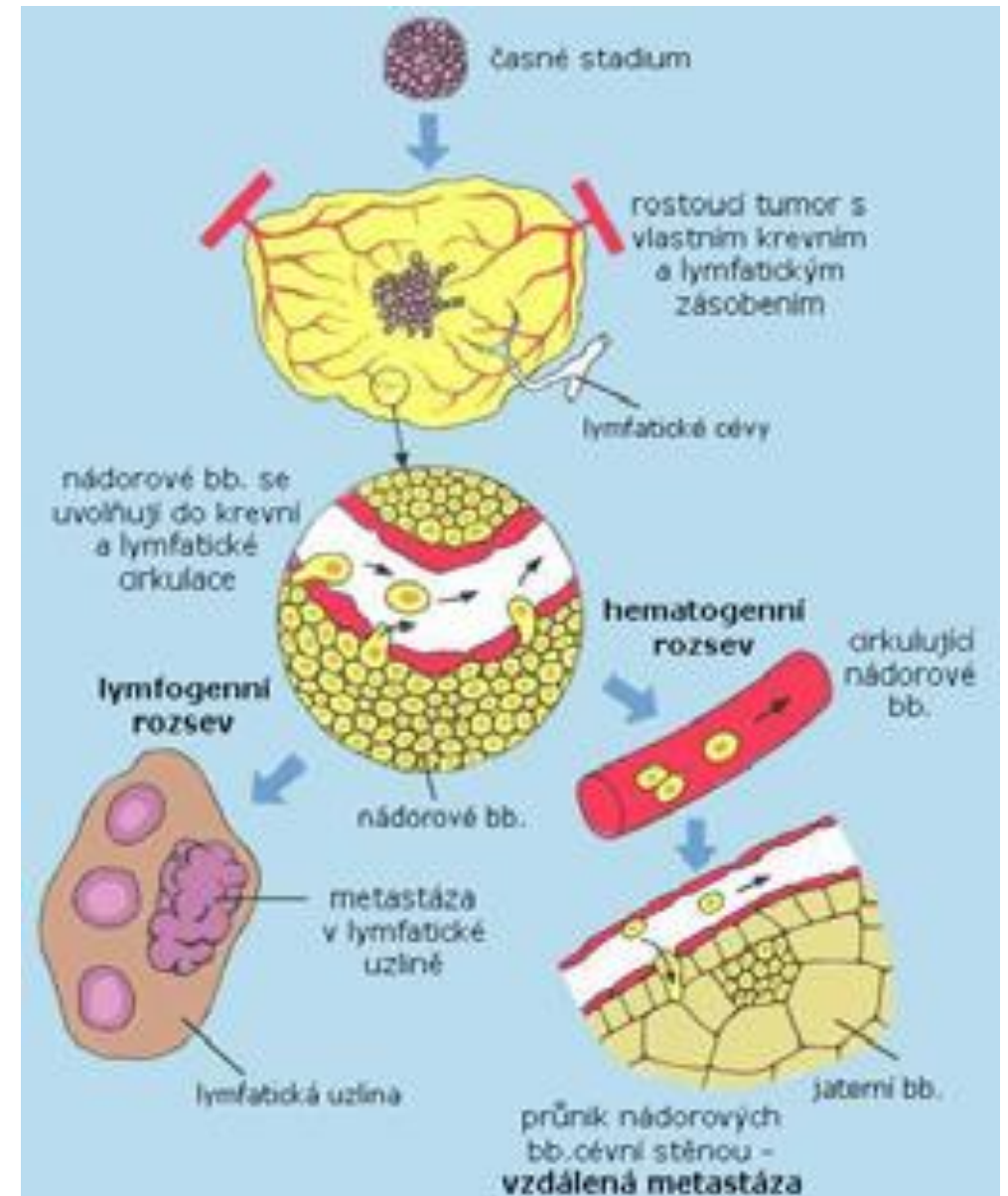
Růst tumoru - angiogeneze

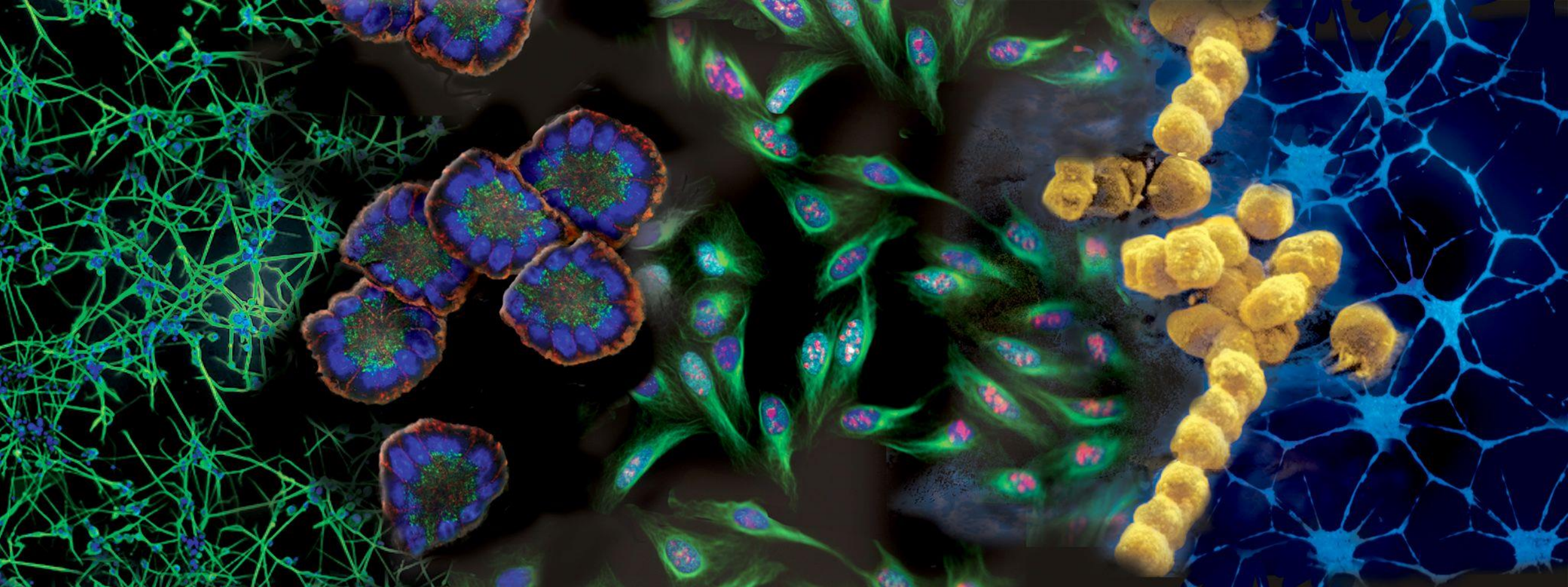
- nádoru obecně převaha proliferace nad zánikem buněk
- **potřeba energie** (kyslík a substráty)
 - buněčná masa velikosti okolo 1mm³ (cca 1×10⁶ buněk) není bez vaskularizace schopna dále růst (proliferace je v rovnováze s apoptózou)
 - v odpovědi na **hypoxii** je produkován hypoxiainducible factor-1 (HIF-1), který po translokaci do jádra ovlivňuje transkripci řady genů, mimo jiné vascular endothelial growth factor (VEGF)
 - tento stimuluje novotvorbu cév (**angiogeneze**) nutných pro další růst nádoru produkce proteolytických enzymů nádor. bb. (matrix metalloproteináz) degraduje extracelulární matrix a umožňuje “pučení” nových cév z existujících
 - proliferace a migrace endotelií je dále potencována angiogenními faktory secernovanými nádorem (např. VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor-β (TGF-β), and platelet-derived growth factor (PDGF))
 - novotvořené cévy tumoru umožňují jeho invazi do kr. řečiště a event. vzdálené **metastazování**
- **hormonální stimulace**
 - růst některých tumorů je výrazně potencován hormony (nejčastěji pohlavními)
 - Ca. prsu, dělohy, vaječníků, prostaty



Metastazování

- vytváření dceřiných nádorů vzdálených od primárního ložiska
 - krví
 - často po směru toku
 - např. z GIT do jater
 - např. venózní krví do plic
 - např. z plic tepennou krví do kostí a mozku
 - lymfou
 - nejprve nejbližší lymf. uzliny, poté vzdálenější





Děkuji za pozornost